[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12N 7/00
C12N 15/33 C12N 15/50
C12N 1/19 C12N 1/21
C12N 5/10 A61K 31/095
A61P 31/12

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95192229.7

[45] 授权公告日 2003 年 9 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 1122105C

[22] 申请日 1995.3.21 [21] 申请号 95192229.7

[30] 优先权

[32] 1994. 3.21 [33] US [31] 08/213,860

[86] 国际申请 PCT/US95/03605 1995.3.21

[87] 国际公布 WO95/25788 英 1995.9.28

[85] 进入国家阶段日期 1996.9.23

[71] 专利权人 研究发展基金会

地址 美国内华达州

[72] 发明人 D·T·布朗

[56] 参考文献

WO,A,94/04185 1994.03.03

JOURNAL OF VIROLOGY, VOL. 64, NO. 5 1990 - 05 - 01 TSCHACHLER ET AL ,

VIROLOGY, OVL. 183 1991 - 01 - 01 GAEDIGK - NITSCHKO ET AL ,

审查员 曾繁辉

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 林蕴和

权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 3 页

[54] 发明名称 新的突变病毒、抗病毒化合物和新的制备疫苗的方法

[57] 摘要

本发明提供了一种组合物，它含有适合用于制备疫苗的无感染性的突变病毒。 还提供了一种用于在哺乳动物细胞中表达的重组质粒，它含有编码无感染性的突变病毒蛋白的 DNA 和该 DNA 在细胞中表达所必需的调控元件。 还提供抑制病毒感染扩散的方法，它包括将该病毒与抑制该病毒巯基还原酶/蛋白二硫键异构酶活性的化合物接触。

ISSN1008-4274

1.一种适用于制备疫苗的无感染性的突变α病毒，其特征在于，该病毒是通过将保守半胱氨酸用不同氨基酸进行置换而突变的，而且该保守半胱氨酸位于负责巯基还原酶/蛋白质二硫键异构酶活性的E1糖蛋白结构域中。

2.如权利要求1所述的α病毒，其特征在于，该α病毒是突变的辛德比斯病毒。

3.如权利要求1所述的α病毒，其特征在于，该突变的辛德比斯病毒是突变型病毒$E1\text{-}SER^{62}$。

4.一种重组DNA质粒，其特征在于，它编码无感染性的突变病毒以及该DNA在细胞中表达所必需的调控元件，其中该病毒是通过将保守半胱氨酸用不同氨基酸进行置换而突变的，而且该保守半胱氨酸位于负责巯基还原酶/蛋白质二硫键异构酶活性的E1糖蛋白结构域中。

5.如权利要求4所述的质粒，其特征在于，该细胞选自下组：酵母、细菌细胞、和哺乳动物细胞。

6.如权利要求5所述的质粒，其特征在于，该酵母选自下组：酵母菌属、毕赤酵母属和克鲁维酵母属。

7.如权利要求5所述的质粒，其特征在于，该细菌细胞选自下组：大肠杆菌、枯草杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、假单胞菌属、链霉菌属和葡萄球菌属。

8.如权利要求5所述的质粒，其特征在于，该哺乳动物细胞选自下组：BHK-21、HeLa、CHO和Vero。

9.如权利要求4所述的质粒，其特征在于，该α病毒是突变的辛德比斯病毒。

10.如权利要求9所述的质粒，其特征在于，该突变的辛德比斯病毒是突变型病毒$E1\text{-}SER^{62}$。

11.一种含有如权利要求4所述质粒的转染细胞。

12.一种含有如权利要求10所述质粒的转染细胞。

13.一种用如权利要求11所述转染细胞产生的无感染性的突变病毒。

14.一种用如权利要求12所述转染细胞产生的无感染性的突变病毒。

新的突变病毒、抗病毒化合物和新的制备疫苗的方法

发明领域

本发明一般涉及病毒学、免疫学和蛋白质化学领域。更具体地，本发明涉及新的抗病毒剂和新的制备疫苗的方法。

相关技术的描述

病毒是复杂的三维结构体，能用作基因传递系统。它们由包裹在外壳内的RNA或DNA基因组构成。外壳由蛋白质构成或者由蛋白质与含脂类的膜双层构成。为了在自然界生存，病毒基因组通过毁灭适当宿主的生化机制而得以复制。这个感染过程通常会导致宿主细胞的死亡，大规模的该感染过程在宿主植物或动物中就表现为疾病。感染过程的最终结果是从感染细胞或组织中释放出成千上万能够感染其他细胞、组织或宿主的子代病毒颗粒。病毒的遗传物质受到外面外壳的保护而免受环境因子的损害。尽管外壳必须抵抗环境因子对其的降解作用，但它必须在病毒感染宿主细胞时分解以释放遗传物质。

已有技术的缺陷在于缺少有效的阻止病毒扩散的手段。已有技术的缺陷还在于缺少有效的保证无感染性的病毒可被用于疫苗的方法。本发明满足了本技术领域中的这些长期需要。

发明概述

在本发明的一个例子中，提供了一种组合物，它含有适合用于制备疫苗的无感染性的突变病毒。

在本发明的另一例子中，提供了一种用于在哺乳动物细胞中表达的重组质粒，它含有编码无感染性突变病毒的DNA和该DNA在细胞中表达所必需的调控元件。

在本发明的另一方面，提供了与巯基还原酶/蛋白异构酶活性有关的病毒。

在本发明的另一方面，提供了抑制病毒感染扩散的方法，它包括该病毒与抑制该病毒巯基还原酶/蛋白二硫键异构酶活性的化合物接触。

在本发明的另一方面，提供了抑制病毒感染扩散的抗病毒剂，其中该抗病毒剂抑制该病毒中巯基还原酶/蛋白二硫键异构酶活性。

本发明其他的和进一步的方面、特征和优点，通过下面出于阐述目的而给出的目前本发明的优选实施例的描述而理解。

附图的简要说明

为了使本发明的上述特征、优点和目的以及其他显而易见的方面可以得到并且仔细理解，对于上面简要总结的本发明的更具体的描述是结合某些实施例进行的，它们在附图中有所阐述。这些附图是说明书的一部分。但是，应注意，附图是用于阐述本发明的优选例子，因此不应认为它们用于限制发明范围。

图 1 显示了存在 2—巯基乙醇(2—ME)和 pH 5.3 时，在 BHK 细胞中的一步外部融合(FFWO)。病毒细胞复合体暴露于低 PH 融合介质中，该介质含有如下所述的各种浓度的还原剂 2—ME。融合情况的评分下述。

图 2 显示了在暴露于 2—ME 的 BHK 细胞中两步 FFWO 的感染复数(MOI)依赖性。将病毒—细胞复合体暴露于含 0.05nM 2—ME(正方形)或不含 2—ME(三角形)的低 PH 融合介质中 5 分钟，再回到中性 PH 并按如下所述的方法对融合情况进行评分。

图 3 显示了 DTNB 对辛德比斯病毒感染性的直接作用。将病毒在不同时间暴露于 1mM DTNB 中，然后在单层 BHK 上测定仍有感染性的病毒的效价。将感染性病毒表示为未处理对照的百分数。

图 4 描绘了在辛德比斯病毒(Sindbis virus)膜穿透和低 PH 诱导的膜融合过程中 E1 的构象变化。图 4A 显示，成熟病毒颗粒中的糖蛋白具有功能域和结构域，它们分别与膜融合和包膜完整性有关。图 4B 显示了因受体—病毒相互作用或因无掩蔽的关键二硫键暴露于低 PH 而诱发的构象变化，从而便于随后二硫键的重新结合。图 4C 显示，负责维持包膜中蛋白质—蛋白质相连的关键二硫键的还原导致了刚性蛋白质二十面体晶格的瓦解，从而可以随后与细胞膜融合。实心方块表示 E1—E1 相连；带阴影的方块表示融合肽。

图 5 显示了辛德比斯突变型病毒 E1—Ser^{62}。细胞用 ^{35}S—甲硫氨酸/半胱氨酸在感染后 5 小时标记，并且在放线菌酮存在时追踪 0 分钟(泳道 1)、5 分钟(泳道 2)、10 分钟(泳道 3)和 20 分钟(泳道 4)。细胞裂解物用针对纯化病毒的抗血清进行免疫沉淀。Ser^{62}产生病毒蛋白 PE2、E1、E2 和 C，其中 PE2 嵌入 E2 中。电子显微镜图显示了从转染细胞的培养基中浓缩并用密度梯度离心法纯化出的病

毒粒子。带放射性的突变型病毒的蛋白质含量示于泳道5。

图6显示了巯基阻断剂DTNB对代表性冠状病毒即小鼠肝炎病毒(MHV)感染细胞的作用。

发明详述

在本发明中,用含有膜的辛德比斯病毒(α病毒的原型),发现该病毒含有一个蛋白域作为其双膜外壳相关糖蛋白中一种蛋白的组份部分,该蛋白结构域在结构和功能方面是具有已知巯基还原酶/蛋白质二硫键异构酶活性的蛋白质的同源物。本发明还显示,典型冠状病毒(小鼠肝炎病毒)的感染机制与辛德比斯病毒的机制相类似,因此该机制也可能被其他病毒采用以感染宿主细胞。

许多动物病毒的表面蛋白质含有复杂的二硫键,这些二硫键用于稳定颗粒并且为了感染和释放病毒基因组必须打开二硫键。本发明鉴别出一种机制,它解释了这些病毒感染宿主时所发生的过程关键。这种独特的、以前从未描述过的活性提供了一种新的控制病毒感染和生产疫苗的策略。

本发明表明,病毒本身在附着于合适的宿主细胞受体后具有还原其二硫键的能力。病毒结构蛋白与宿主受体的相互作用引发了病毒的构象变化,从而发生还原事件。

本发明阐明,巯基—二硫键的交换对α和冠状病毒感染细胞是至关重要的。对α病毒而言,该还原事件由位于病毒本身的巯基—还原酶/二硫键异构酶活性所进行。许多病毒(包括HIV)含有二硫键,已表明这些二硫键对病毒的结构和装配是重要的。病毒结构的完整性取决于这些二硫键,这些二硫键又必须被打开以便进行感染宿主的过程。本发明的突变型病毒代表了一种新的产生无感染性病毒用作疫苗的方法。与其他疫苗相比,本发明的突变型病毒的优越之处在于,不需要用化学或物理处理使其失活。因此,它们可给免疫系统提供与在感染性病毒粒子中存在的抗原更接近的抗原。本发明还描述了鉴别能干扰外源巯基—还原酶活性从而能作为防止病毒感染扩散的药物的化学试剂的方法。与病毒相关的巯基还原酶与已知的这类酶是同源的。因此,在一种病毒中能够阻断这些活性中的某种活性的试剂也能阻断其他病毒中的活性。

本发明涉及一种组合物,它含有适合用于制备疫苗的无感染性的突变病毒。一般,该病毒通过用一种氨基酸取代保守性半胱氨酸而进行突变。本领域的一般技术人员会很容易地意识到,在本发明的方法和组合物中只有少量氨基酸可用于替换半胱氨酸。例如在本发明的方法和组合物中,用丝氨酸替换特定的半胱氨

酸。较佳地，被置换从而产生本发明的突变病毒的氨基酸是那些位于负责巯基还原酶/蛋白质二硫键异构酶活性的病毒蛋白结构域中的保守半胱氨酸。

应指出，本发明方法和本发明提供的组合物可涉及任何已知病毒。较佳地，突变病毒是选自下组病毒的突变型病毒：α病毒和冠状病毒。代表性的α病毒例子是辛德比斯病毒。代表性的冠状病毒的例子是小鼠肝炎病毒。突变的辛德比斯病毒的代表性例子是突变型病毒 E1－SER^{62}。

本发明提供了用于在细胞中表达的新的质粒，它含有编码无感染性突变病毒的DNA和该DNA在细胞中表达所必需的调控元件。本发明的质粒可用于在细菌、酵母、昆虫或哺乳动物中进行表达。酵母的代表性例子有酵母菌属、毕赤酵母属和克鲁维酵母属。细菌细胞的代表性例子有大肠杆菌、枯草杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、假单胞菌属、链霉菌属和葡萄球菌属。哺乳动物细胞的代表性例子有BHK－21、Vero、HeLa和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

本发明的质粒含有本发明的突变病毒。较佳地，病毒是α病毒和冠状病毒。突变的α病毒的代表性例子是突变的辛德比斯病毒。突变的辛德比斯病毒的代表性例子是突变型病毒 E1－SER^{62}。

本发明还提供了新的转染细胞。转染细胞的代表性例子包括含有权利要求7所述质粒的转染细胞以及含有权利要求14所述质粒的转染细胞。此外。本发明还公开了用本发明的转染细胞产生的无感染性的突变病毒。

本发明还提供了抑制病毒感染扩散的方法，它包括步骤：将该病毒与抑制该病毒巯基还原酶/蛋白二硫键异构酶活性的化合物接触。还提供了抑制病毒感染扩散的抗病毒剂，其中该抗病毒剂抑制该病毒中巯基还原酶/蛋白二硫键异构酶活性。在看完本发明的教授内容后，本领域的一般技术人员可以轻易地设计出其他的、能抑制感兴趣病毒中巯基还原酶/蛋白二硫键异构酶活性的化合物。

下列实施例的给出是为了阐述本发明的各种不同体现形式，并不以任何方式限定本发明。

实施例 1

细胞、病毒和培养基

在37℃，于添加有10％小牛血清(GIBCO)、5％胰蛋白胨磷酸盐汤和2 mM L－谷氨酰胺的Eagle's极限必需培养基(MEM)中培养BHK－21细胞。最初由E. Pfefferkorn(Darmouth Medical College)提供的耐热辛德比斯病毒(SVHR)低(感染)复数条件下地传代，然后在BHK－21细胞上测定效价，如Renz和

Brown 在 J. Virol. 19:775—781(1976)中所述。

实施例 2

辛德比斯病毒介导的 FFWO

辛德比斯病毒介导的 FFWO 的变化是 4℃、60 分钟内 1000PFU SVHR/细胞至单 BHK 层。接着用 37℃融合介质替换病毒接种液，融合介质由不含碳酸氢盐的 Eagle's MEM、10mM MES(2—(N—吗啉代)乙烷磺酸)和 10mM HEPES(N—2—羟基乙基哌嗪—N'—2—乙烷磺酸)组成，PH 被调节至 5.3，含有或不含各种浓度的 2—巯基乙醇(2—ME)。在 37℃保温 5 小时后用相差显微镜分析融合情况，并用下列标准进行评分：—，无融合；+，低于 25%细胞融合；++，25%细胞融合。简而言之，在低 PH 下 FFWO 通过吸收而诱导至 50%细胞融合；+++，50—95%细胞融合；++++，大于 95%细胞融合。融合度用 1—(细胞数目/核数目)表示。按上述方法诱导双 PH 步骤 FFWO，除了使用各种(感染)复数的 SVHR，融合介质含有 0.05 nM 2—ME，病毒—细胞复合体在低 PH 融合介质中保温 5 分钟后就回到生长培养基中。在 37℃保温 1 小时后在相差照明下拍摄单细胞层照片，然后按上述方法进行评分。

实施例 3

药物

将 DTNB 溶解在不含血清的 MEM 中。用将[^{3}H]尿嘧啶核苷掺入可用三氯乙酸(TCA)沉淀的细胞 RNA、或用锥虫蓝排斥法、或用中性红摄入法分析表明，高至 5mM 的 DTNB 浓度并不影响细胞的存活。DTNB 对辛德比斯病毒的直接效应的确定是通过：将该试剂与病毒一起孵育不同时间，通过系列稀释于含 3%小牛血清的磷酸盐缓冲液中而终止孵育，然后在 BHK 细胞上按标准的噬菌斑分析法测定其效价，如 Renz 和 Brown 在 J. Virol. 19:775—781(1976)中所述。

实施例 4

穿透分析

病毒 RNA 合成的分析是通过测定在 BHK 细胞的可用 TCA 沉淀的物质中[^{3}H]尿嘧啶核苷的掺入情况。在感染前，该 BHK 细胞用 4 微克放线菌素 D/毫

升处理90分钟，并且始终保留在放线菌素D中。相对于在4℃ 5 PFU SVHR/细胞的1小时吸附而言，在3个不同时间将等量数目BHK细胞的单细胞层(monolayer)用1 mM DTNB在37℃处理30分钟。在吸附后，所有的单细胞层都用不含血清的MEM洗涤，然后在37℃孵育以便使吸附的病毒穿透细胞。30分钟DTNB处理分别是在刚好吸附之前、在37℃穿透期间、或在穿透期间之后立刻进行。在DTNB处理后，洗涤单细胞层。在穿透之后90分钟，加入[^{3}H]尿嘧啶核苷(10μCi/ml)。在5小时时，用十二烷基磺酸钠裂解单细胞层，用10%冰冷的TCA沉淀并放射性计数。对于在上述处理条件下暴露于1 mM DTNB 60分钟的BHK单细胞层，还通过噬菌斑形成分析其穿透情况。按Renz和Brown在J. Virol. 19:775—781(1976)中所述的方法确定噬菌斑的形成。

实施例5

在低PH下的FFWO

辛德比斯病毒介导的FFWO的速度取决于暴露于低PH后细胞所返回的PH值(Edwards and Brown, J. Gen Virol., 67:377—380(1986))。在较高PH下的融合进行得较快，在PH 5.3的低PH阈值(这是一旦返回中性后建立融合条件所必需的)时融合不进行。巯基—二硫键交换反应同样也是依赖于PH的，因为反应速度直接受PH的影响，只有在中性至碱性环境中才能有效地反应，如Feener er al. 在J. Biol. Chem. 265:18780—18785(1990)中所述。如果在膜融合之前，病毒关键二硫键的还原是瓦解刚性包膜蛋白质晶格所必需的话，那么这种还原可在低PH下被阻止。

为了阐述这种还原事件在辛德比斯病毒介导的BHK细胞的FFWO中的作用，在低PH和存在还原剂2—ME下进行融合。与DTT和半胱氨酸不同，2—ME在PH5.0和更高的PH下是有效的还原剂(Torchinskii, Sulfhydryl and Disulfide Groups of Proteins, Plenum Publishing, N. Y. 1974)。用大范围2—ME浓度进行处理时发现可在pH5.3时诱导FFWO，尽管该浓度范围可变化。在低PH下2—ME诱导的融合对许多因素高度敏感，其中包括细胞的传代数目和单细胞层的汇合度，这些因素对于返回至中性PH后的融合过程并不重要。在无病毒时用2—ME处理单细胞层以及在PH5.3时和无2—ME时孵育病毒—细胞复合体都不诱导融合。诱导FFWO必需极低浓度的还原剂，这暗示被还原的关键二硫键是十分勉强的。高浓度的2—ME并不能促进融合，这可能是因为病毒包膜在融合事件发生前便已被破坏了。辛德比斯病毒介导的FFWO可在低

PH、存在低浓度 2—ME 下进行，这与关键的病毒二硫键的还原对病毒—细胞融合过程至关重要是一致的。此外，这可以解释 FFWO 为什么要返回中性 PH 环境。

实施例 6

2—ME 对 FFWO(感染)复数需求的影响

在低 PH 下 2—ME 对融合的诱导作用表明，辛德比斯病毒诱导的 FFWO 的有效性取决于还原事件。图 2 显示了 2—ME 对典型辛德比斯病毒介导的 FFWO 的(感染)复数需求的影响。当病毒—细胞复合体在 FFWO 过程中短暂暴露于低 PH 时存在还原剂，会增加返回中性环境后融合的效率。在(感染)复数低至 100 PFU/细胞时，用 2—ME 处理的单细胞层中获得了最佳融合效果，而不用 2—ME 处理时一般需要 500—1000PFU/细胞的(感染)复数。FFWO 的高(感染)复数的需要必定部分反映附着病毒粒子形成多细胞接触的频率，这是一种对细胞—病毒—细胞融合事件的空间需要。如果该融合现象取决于巯基—二硫键交换反应，高(感染)复数需要也反映了关键二硫键与适当巯基供体相关联的频率。因为外源还原剂 2—ME 的存在而导致巯基数目的增加可减少产生最大细胞—细胞融合所需的病毒粒子的数目。这受到短暂暴露于 2—ME 后，产生最大融合所需(感染)复数减少的支持。

实施例 7

在辛德比斯病毒穿透 BHK 细胞中的巯基—二硫键交换反应

本发明显示，在进入过程的膜融合中，需要还原辛德比斯病毒刚性包膜蛋白晶格中的二硫键。DTNB 是可穿过膜的巯基阻断剂，它通过巯基—二硫键交换反应共价地修饰巯基。因为它不直接影响辛德比斯病毒的感染性(图 3)，也不影响 BHK 细胞的生存性，因此 DTNB 是一种出色的、阐述巯基—二硫键交换反应(该反应在辛德比斯病毒穿透过程中发生于细胞膜)的试剂。

实施例 8

DTNB 对病毒穿透的影响

DTNB 对低(感染)复数感染下的病毒穿透的影响是在实施例 4 和表 I 中所述的 3 种处理条件下，通过[^{3}H]尿嘧啶核苷掺入病毒 RNA 情况加以分析的。存

在放线菌素D时，用1 mM DTNB处理BHK细胞30分钟，处理或者刚好在4℃吸附病毒之前、或者在37℃病毒穿透期间、或者在穿透期间之后立刻进行。在各种情况下，都在穿透期后5小时通过测量[^{3}H]尿嘧啶核苷在可用TCA沉淀的物质中掺入量而分析病毒RNA。在感染之前用DTNB处理细胞对病毒RNA合成有轻微的抑制作用，而在病毒穿透期间的处理可抑制RNA合成至对照水平的约40%。在感染之前处理细胞中所看到的RNA合成的下降同样是因为没有在感染前将所有的药物除去。在最初穿透期之后用DTNB处理有一定的抑制效应。但是，在这种处理之后RNA合成的抑制可能是由下列事实造成的：辛德比斯病毒感染增加了细胞的透过性，从而使某些可透过膜的试剂直接进入细胞质，进而产生副作用。

DTNB对辛德比斯病毒穿透的影响还通过分析噬菌斑形成加以确定，如表I所示。在表I所示的研究中，在4℃使病毒吸附于等量数目的BHK细胞1小时，然后再置于温MEM中，在37℃孵育以便进行穿透。在指定的时间用1 mM DTNB处理细胞30分钟(A)或60分钟(B)。接着洗涤单细胞层以便除去药物，然后于37℃，在不含DTNB的培养基中孵育。数据是5个独立试验的平均值加减标准差。在细胞回升至37℃以引发穿透之后5小时，确定总病毒RNA。感染后，单细胞层用琼脂糖铺盖并用中性红染色48小时。

用DTNB预处理细胞会轻微地抑制噬菌斑形成，而在感染期间处理会抑制噬菌斑形成至未处理对照的约46%。同样，在感染前用DTNB处理单细胞层时所获得的噬菌斑形成的下降可能是由于在感染前不能去除所有的试剂所造成的。在感染后用DTNB处理对噬菌斑的形成无抑制效应，这与下列情况是一致的：在感染后用DTNB处理时RNA水平的抑制并不是由病毒穿透的直接效应所造成的。尽管有些矛盾，在感染后处理的细胞培养物中发现较多数目噬菌斑，其重复性较高。

表 I

DTNB对辛德比斯病毒穿透细胞的影响

测定项目	处理时间	占对照的百分比
病毒RNA合成	穿透前	82±11
	穿透期间	40±10
	穿透后	81±13
噬菌斑形成	穿透前	80±11
	穿透期间	46±10

穿透后 110±13

在感染期间存在DTNB时，DTNB能最有效地抑制辛德比斯病毒的穿透，这一有趣的观察现象暗示，通过病毒与其受体之间的协同作用，靶巯基基团在进入过程中是暴露的。该相互作用协作而快速，这样形成的环境使DTNB不能有效地与正在进行巯基-二硫键交换反应的病毒二硫键竞争。这种反应具有快速的反应速度，在PH8.0时约为10^{-6}秒。不能有效地烷基化关键巯基便不能完全阻断辛德比斯病毒穿透。

图4描绘了在辛德比斯病毒膜穿透和低PH诱导的膜融合过程中E1的构象变化。图4A显示，成熟病毒粒子中的糖蛋白具有功能域和结构域，它们分别与膜融合和包膜完整性有关。图4B显示了因受体-病毒相互作用或因暴露关键二硫键于低PH而诱发的构象变化，从而便于随后二硫键的重新结合。图4C显示，负责维持包膜中蛋白质一蛋白质相连的关键二硫键的还原导致了刚性蛋白二十面体晶格的瓦解，从而随后可以与细胞膜融合。实心方块表示E1—E1相连；带阴影的方块表示融合肽。

包膜病毒与细胞膜在穿透过程中的融合是由蛋白质介导的，这与细胞间和细胞内的融合事件相同。在α病毒与细胞膜的融合中涉及包膜蛋白E1中融合域的暴露。此外，本发明显示，起稳定包膜的E1—E1作用的二硫键必须被断开以便进行膜融合。在穿透过程中辛德比斯病毒包膜蛋白质-蛋白质相互作用分解的最可能的机制是，这些其稳定作用的二硫键通过巯基-二硫键交换反应而还原。

巯基-二硫键交换反应通过离子化的巯基对二硫键的亲核性进攻而发生，而且它高度取决于环境PH、巯基的pKa和空间位阻效应。因此半胱氨酸介导的巯基—二硫键交换反应需要中性至碱性PH。由耐热的辛德比斯病毒株介导的FFWO需要暴露于PH5.3并且随后返回大于6的PH中以诱导融合。随着病毒一细胞复合体所返回的PH的上升，融合速度也增加。在低于融合所需的低PH阈值时，不发生融合。同样，DTT导致的病毒包膜快速分解也需要短暂地暴露于PH5.3随后返回至中性PH。这些观察结果表明了中性PH环境在巯基-二硫键交换反应中的明确作用。本发明的这些内容阐明，对于病毒一细胞融合，巯基-二硫键交换反应在融合过程中是至关重要的。

低PH介导的FFWO过程与感染过程的不同之处在于，它需要高(感染)复数的病毒而且不依赖于蛋白质受体。然而，两种过程都必须提供在融合之前使包

膜蛋白质晶格瓦解的机制。本发明显示，这两种事件都类似地取决于巯基—二硫键交换反应。添加非常低浓度的还原剂 2—ME(与 DTT 和生物巯基不同，它在 PH5.3 时能有效地还原。)，会促进在酸性环境中的细胞融合。这暗示，通过关键二硫键的化学还原可以在原本不利的还原环境中诱导融合。促进融合需要极低浓度的 2—ME 表明，被还原的关键二硫键处于非常勉强的结构。低 PH 诱导的包膜蛋白质构象变化可能负责使这些勉强的关键二硫键暴露出来，这可用于解释为什么在暴露于低 PH 后，体外 DTT 介导的病毒解体进行得如此快速。

辛德比斯病毒穿透宿主细胞的过程是依赖于受体的。已鉴别出数种可能的受体。病毒与细胞表面受体在中性 PH 下的相互作用，诱导病毒糖蛋白构象在穿透之前发生变化。本发明表明，受体和病毒的协同作用诱导构象变化，这种变化使得包膜蛋白质内的关键二硫键通过巯基-二硫键交换反应而还原。从受体诱导构象变化到包膜蛋白质晶体的瓦解和融合之间的过程同样进行得非常迅速。起稳定作用的二硫键和关键巯基在天然状态下是 DTT 和 DTNB 等分子无法触及的这一事实，以及在受体诱导构象变化后还原事件进行得极其迅速，这些可用于解释为什么 DTNB 不能有效地阻断该过程。介导还原事件的巯基可位于受体蛋白质或位于病毒本身。在后一种情况下，在附着后二硫键的重新组合可导致包膜蛋白质晶体的瓦解。在这种模式中，病毒与适当受体的相互作用改变了 E1 的构象，从而有利于二硫键通过巯基—二硫键交换反应重新组合。二硫键的重新组合导致包膜中刚性蛋白质—蛋白质相连关系的瓦解，使得随后病毒包膜可与细胞膜发生融合。

实施例 9

突变型病毒 E1—SER^{62}的产生

从 Genebank 收集具有已知巯基—还原酶/蛋白质二硫键异构酶活性的蛋白质的结构。尽管在这些蛋白质的阻断功能域中没有绝对保守的氨基酸序列，但在含有正电荷—碱性氨基酸的蛋白质结构域中都不变地含有“供体”半胱氨酸。事实上，这些蛋白质的巯基还原酶活性可通过增加该结构域的净正电荷而增加。检查了所有已知 α 病毒的 E1 糖蛋白的氨基酸序列。该检查揭示，有两个半胱氨酸(62&79)是保守的，而且位于典型的、已知具有巯基还原酶活性的、带正电荷的结构域中。因此，由消除这些半胱氨酸中的一个而形成的突变，可通过消除与该结构域有关的巯基还原酶活性而使病毒无感染性。

将辛德比斯病毒 E1 糖蛋白序列中 62 位的半胱氨酸突变成丝氨酸，这是用

Liu and Brown,J. Cell. Biol.，120:877－883(1993)中所述的巨引物PCR诱变法产生的。构建两个引物作为“末端引物”:代表序列9760－9779的引物A和核苷酸10445－10436的引物B。

引物A＝5′－CGATGATGATTGGCGTAACT－3′

引物B＝5′－CGAAAAATCAAATCCTGCGGCTCC－3′

带有G→C碱基变化的“突变型引物”有核苷酸10236－10259构成：

5′－CCAAAAATCAAATCCTGC－3′

G(野生型)

巨引物的产生是通过:将突变型引物与引物B加至模板Toto,产生第一产物,即含有突变和在10381有SPL I酶切位点的核苷酸10236－10445。

通过将第一次PCR反应的产物与引物A合并,使突变型巨引物延伸以引入第二个选择性酶切位点。模板是纯化的、用限制性内切酶STU I和SPL I消化而产生的Toto 1101片段(核苷酸8571－10381)。第二次产物是带有所需突变和BSI W(核苷酸9804)和SPL I(核苷酸10381)酶切位点的核苷酸9760－10445。

用酶BSI W和SPL I从Toto 1101片段和第二次PCR产物中切下核苷酸9804－10381。将上述的突变型产物连入Toto 1101中替代野生型序列,得到含有辛德比斯病毒序列的质粒,它在62位带有使丝氨酸替换半胱氨酸的碱基。该质粒在大肠杆菌中扩增,从该质粒在体外转录而得的RNA被用于转染BHK－21(哺乳动物)细胞以产生图5所示的病毒。

本发明的克隆用SP6启动子从克隆中产生信使RNA。当克隆被用于进行体外转录反应时,该RNA与原始病毒的RNA是相同的。当该反应的RNA产物被转染进入培养的哺乳动物细胞时,它导致感染,感染按原始病毒的相同方式进行(见图5)。产生与正常病毒在结构和生物化学上无法区分的成熟病毒(除了用丝氨酸进行替换之外)。然而用标准测定程序分析发现,这些病毒颗粒完全没有感染性。

本发明表明,当病毒与细胞表面受体发生作用时,在病毒膜糖蛋白结构中发生构象变化。该构象变化是膜穿透过程的必要条件。构象变化使巯基基团暴露出来,该巯基基团可与巯基阻断剂二硫代硝基苯(dithionitrobenzene)发生化学反应。该试剂与巯基的反应阻止了病毒的穿透过程。靶关键巯基或者位于细胞表面受体蛋白质上,或者位于病毒膜糖蛋白上。

本发明提供了直接的遗传学证据,表明巯基供体以及二硫键靶两者都位于

病毒糖蛋白 E1 上，而且在 E1 序列中半胱氨酸 62 周围(含 62 位)的蛋白质结构域具有的活性与已知的巯基还原酶/蛋白质异构酶活性类似。

实施例 10

冠状病毒

巯基阻断剂 DTNB 对典型冠状病毒小鼠肝炎病毒感染细胞的影响示于图 6。如图所示，在病毒感染之前、之中或之后用 DTNB 处理组织培养细胞。抽提病毒 RNA，来自等量细胞的病毒 RNA 用凝胶电泳法分离。光密度计(densitometer)追踪揭示，当感染发生时存在 DTNB 时，6 种病毒 RNA 的数量减少了 50%。与没有加入 DTNB 的对照(最右的泳道)相比，在前处理和后处理试验中，DTNB 并不明显改变 RNA 的数量。因此，小鼠肝炎病毒的结果与辛德比斯病毒中发现的结果是一致的，它表明，对于含膜冠状病毒的感染而言，巯基—二硫键交换反应是至关重要的。

在本说明书中提及的所有专利和出版物提示了本发明所属领域中一般技术人员的水平。所有的专利和出版物都同样程度地引用作为参考，如同各出版物都被特别而单独地指出被引用作为参考一样。

本领域的技术人员会容易地理解，本发明可很好地用于实现本发明目的并获得提及的和内在的各种结果和优点。此处描述的实施例、方法、程序、处理方法、分子和具体化合物是目前优选例子的代表，是示范性的，不用于限制本发明的范围。在本发明宗旨和权利要求书所限定的范围内，本领域的技术人员可作出各种改变和其他用途。

序列表

(1) 一般信息：

(i) 申请人：Brown，Dennis

(ii) 发明名称：新的突变病毒、抗病毒化合物和新的制备疫苗的方法

(iii) 序列数目：3

(iv) 通信地址：

(A) 地址：James F. Weiler，律师

(B) 街道：One Riverway，Suite 1560

(C) 城市：Houston

(D) 州：Texas

(E) 国家：U.S.A.

(F) 邮编：77056

(v) 计算机可读形式：

(A) 记录介质类型：软盘

(B) 计算机：IBM PC 兼容型

(C) 操作系统：PC－DOS/MS－DOS

(D) 软件：WordPerfect 6.0

(vi) 本申请数据：

(A) 申请号：

(B) 申请日：3－21－95

(C) 分类：

(viii) 律师/代理人信息：

(A) 姓名：Weiler，James F.

(B) 登记号：16,040

(C) 卷宗/档案号：D－5712 PCT

(ix) 通讯信息：

(A) 电话：713－626－8646

(B) 传真：713－963－5853

(2) SEQ ID NO:1 的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：20

(B) 类型：核酸

(C) 股性：双链

(D) 拓扑结构：线性

(ii)分子类型：

(A)描述：其他核酸

(iii)假设：否

(iv)反义：否

(vi)最初来源：

(B)菌株：

(C)单独分离物：

(D)发育阶段：

(F)组织类型：

(G)细胞类型：

(H)细胞系：

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:1：

CGATGATGAT TGGCGTAACT 20

(3) SEQ ID NO:2 的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：34

(B) 类型：核酸

(C) 股性：双链

(D) 拓扑结构：线性

(ii)分子类型：

(A)描述：其他核酸

(iii)假设：否

(iv)反义：否

(vi)最初来源：

(B)菌株：

(C)单独分离物：

(D)发育阶段：

(F)组织类型：

(G)细胞类型：

(H)细胞系：

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:2：

CGAAAAATCA AATCCTGCGG CTCC 34

(4) SEQ ID NO:3 的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：18

(B) 类型：核酸

(C) 股性：双链

(D) 拓扑结构：线性

(ii)分子类型：

(A)描述：其他核酸

(iii)假设：否

(iv)反义：否

(vi)最初来源：

(B)菌株：

(C)单独分离物：

(D)发育阶段：

(F)组织类型：

(G)细胞类型：

(H)细胞系：

(ix)特征：

(A)其他：

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:3：

CCAAAAATCA AATCCTGC 18

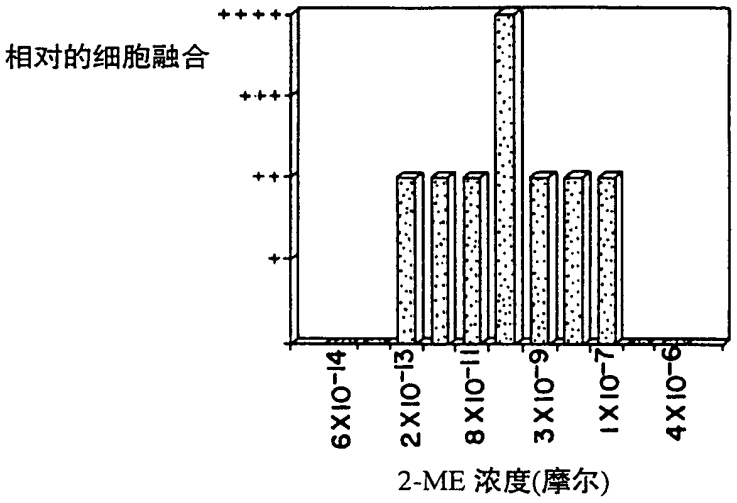
相对的细胞融合
++++
+++
++
+
6X10⁻¹⁴
2X10⁻¹³
8X10⁻¹²
3X10⁻⁹
1X10⁻⁷
4X10⁻⁶
2-ME 浓度(摩尔)

图 1

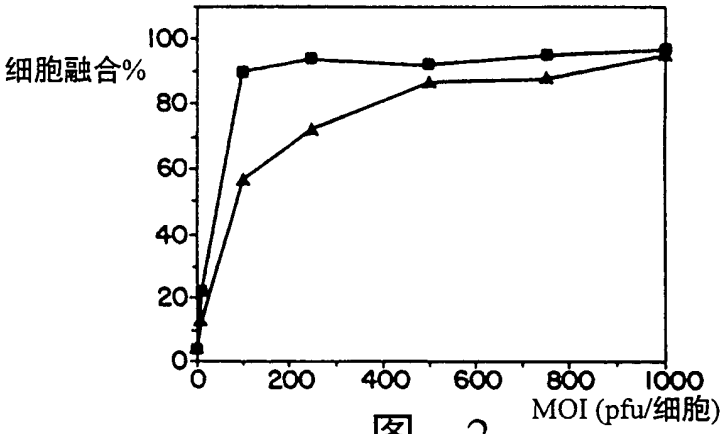
细胞融合%
100
80
60
40
20
0
0
200
400
600
800
1000
MOI (pfu/细胞)

图 2

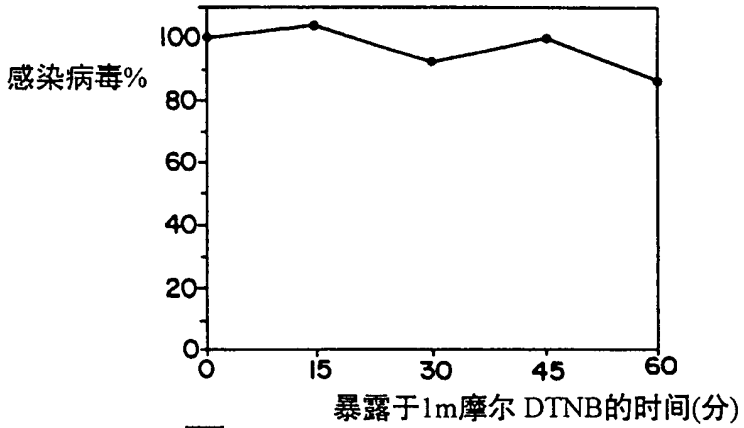
感染病毒%
100
80
60
40
20
0
0
15
30
45
60
暴露于1m摩尔 DTNB的时间(分)

图 3

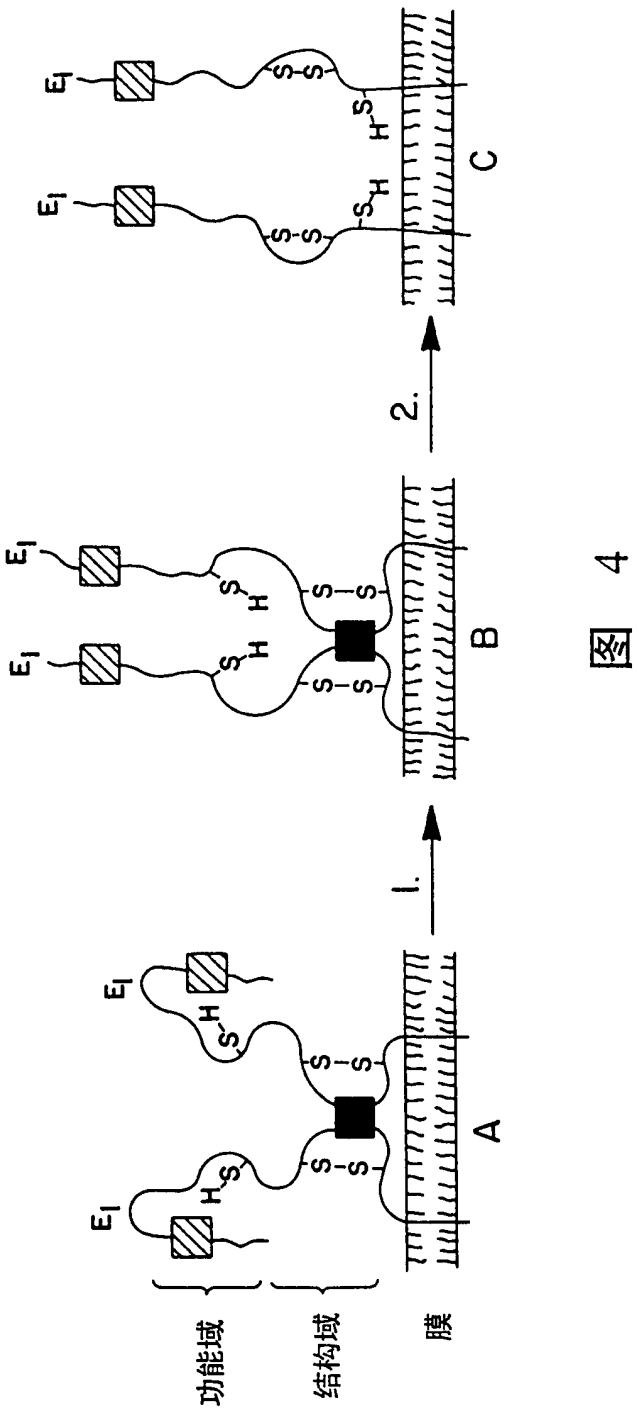

图 4

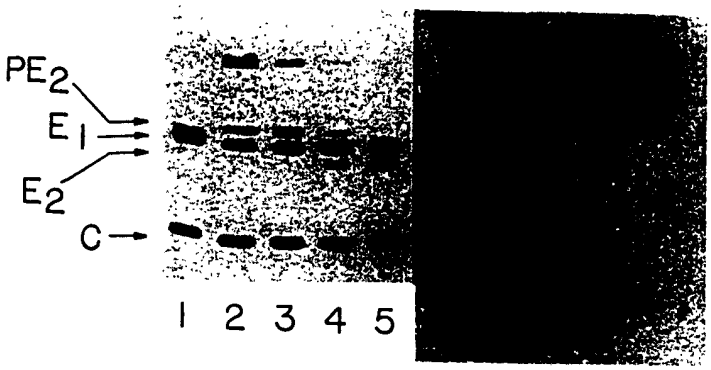

图 5

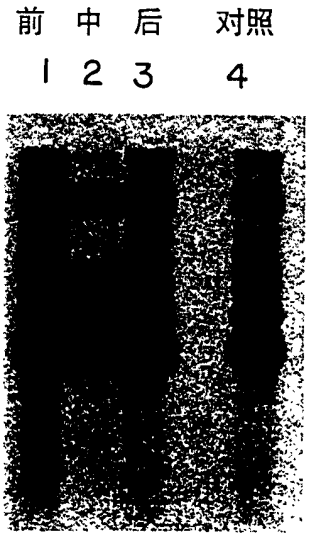

图 6